

Polymorphisme enzymatique chez le palmier à huile

(*Elaeis guineensis* Jacq.)

I. — Contrôle génétique de neuf systèmes enzymatiques

M. GHESQUIÈRE (1)

Résumé. — Une étude du polymorphisme enzymatique a été entreprise pour estimer la variabilité génétique et son organisation parmi quelques origines de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). Les techniques d'électrophorèse utilisées ont fait appel aux méthodes classiques de migration et de révélation des enzymes dans des gels d'amidon ou de polyacrylamide. Neuf systèmes enzymatiques ont été ainsi analysés à partir d'extraits de pollen. L'observation de différentes autofécondations et d'un croisement a permis de conclure à l'existence de trente-huit allèles, gouvernés par quatorze locus polymorphes dont deux couples sont étroitement liés.

INTRODUCTION

L'électrophorèse consiste à séparer dans un milieu liquide ou poreux des molécules chargées sous l'action d'un champ électrique. Dans le cas des protéines et plus particulièrement celui des enzymes solubles, l'électrophorèse met en évidence, par des différences de migration, des formes multiples d'une même enzyme, des isozymes, ayant même fonction catalytique mais différant sensiblement par leur charge électrique et leur poids moléculaire. Les différences de migration observées étant directement liées à la constitution en acides aminés des enzymes, sont attribuées à des modifications dans les séquences nucléotidiques des gènes codant pour ces enzymes, c'est-à-dire à des substitutions d'ordre allélique de ces gènes.

Avec le développement de cette technique dans les années 1950, notamment grâce à Smithies [1955], qui introduisit le premier l'électrophorèse analytique sur gel d'amidon, un outil particulièrement intéressant était mis à la disposition des généticiens des populations. On allait pouvoir ainsi connaître le génotype exact d'individus échantillonnés dans des populations et estimer leur variabilité génétique par des taux de polymorphisme et des taux d'hétérozygotie [Lewontin, 1974].

Une étape fondamentale dans l'utilisation de cette technique fut franchie par Lewontin et Hubby [1966] sur la drosophile et par Harris [1966] chez l'homme, en montrant l'importance du polymorphisme enzymatique manifesté par les populations naturelles. L'interprétation évolutive de la variabilité génétique révélée par électrophorèse reste encore sujette à de nombreuses controverses, une des difficultés majeures étant d'estimer quel est le niveau réel de cette variabilité et sa représentativité vis-à-vis du reste du génome [Jones, 1982]. Cependant, au-delà de sa signification, le polymorphisme enzymatique reste un moyen incomparable pour décrire la variabilité génétique des

populations et son évolution dans le temps et dans l'espace sous l'effet de divers facteurs en permettant un marquage génotypique direct des individus.

Depuis une dizaine d'années, un grand nombre de travaux ont été réalisés dans ce sens chez les végétaux. Cependant, il n'existe actuellement que peu de données concernant le polymorphisme enzymatique de plantes tropicales cultivées. Cette méthode d'analyse de la variabilité génétique se justifiait particulièrement dans le cas du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.), plante pérenne, strictement allogame et endémique dans toute la zone guinéenne de l'Afrique occidentale. En effet, les conditions propres à son amélioration génétique rendaient nécessaire une meilleure connaissance de sa variabilité génétique et de sa structure. Les premières tentatives d'amélioration du palmier datent du début du siècle, mais il a fallu attendre 1957 pour qu'une stratégie génétiquement fondée soit engagée par l'I.R.H.O. au moyen d'un programme de sélection récurrente réciproque [Meunier et Gascon, 1972]. Ce schéma de sélection est basé sur des croisements entre deux groupes de palmiers composés de différentes origines dont Gascon et de Berchoux [1964] avaient montré la supériorité de la production annuelle d'huile par rapport aux croisements intra-origines. Cependant, les contraintes inhérentes aux caractéristiques biologiques du palmier : pérennité, longueur du cycle, encombrement végétatif... conduisent à limiter actuellement les possibilités d'introduction et d'évaluation de nouveau matériel pour la sélection. D'autre part, l'affectation d'une origine de palmiers dans l'un ou l'autre groupe du schéma a une importance fondamentale puisqu'elle conditionne les croisements interorigines qui seront entrepris par la suite et les chances d'obtenir des hybrides d'une bonne valeur. La variabilité génétique et les relations entre origines constituent ainsi deux aspects essentiels de l'amélioration du palmier à huile.

L'étude du polymorphisme enzymatique chez le palmier à huile a donc été engagée dans cet esprit [Ghesquière, 1983] ; en préliminaire, cet article a pour objet l'analyse du déterminisme génétique des marqueurs enzymatiques révélés par électrophorèse.

(1) Laboratoire d'Electrophorèse, GERDAT, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

I. — MATÉRIEL

L'ensemble des électrophorèses a porté sur 252 arbres, répartis en 40 descendance et provenant de quatre origines géographiques principales : Indonésie-Malaisie, Angola, Zaïre et Côte d'Ivoire. On y trouve essentiellement des arbres qui ont été utilisés comme géniteurs lors du premier cycle de sélection par l'I.R.H.O. (La Mé, Yangambi, Sibiti, Déli), ainsi que des palmiers prospectés plus récemment (Yocoboué, Angola). Des autofécondations et un croisement de quelques-uns de ces arbres ont permis de tester également la validité du déterminisme génétique des marqueurs enzymatiques.

Les analyses électrophorétiques ont été conduites sur des échantillons de pollen collectés et conditionnés par la station de recherche de La Mé et la plantation expérimentale Robert-Michaux (Côte d'Ivoire) d'une façon identique à celle employée pour les fécondations artificielles.

II. — MÉTHODES

Extraction.

Les extractions de pollen sont effectuées pendant 1 minute à l'aide d'un potter de Kontes de 1 ml placé dans de la glace fondante. Une solution de Tris HCl 0,1 M, à un pH de 7,2 et dans un rapport de 120 mg de pollen par ml de solution, a été utilisée comme tampon d'extraction. Après broyage, les échantillons sont centrifugés sous température contrôlée (4 °C) à 49 000 g pendant 20 min. Le surnageant est réparti ensuite dans des tubes Eppendorf à raison de 25 µl par tube, congelés immédiatement à - 20 °C.

Migration.

Quatre méthodes de migration nécessitant des gels d'amidon ou de polyacrylamide ont été expérimentées.

Gel d'amidon.

La préparation des gels s'effectue de façon habituelle, en portant à ébullition une solution à 12 p. 100 ou 14 p. 100 d'amidon (Connaught Laboratories Limited, Willowdale, Ontario, Canada) dans le tampon adéquat (Tabl. I). Après dégazage à la trompe à eau, l'empois est coulé dans des cuves d'altuglass de 23 × 8 × 0,9 cm. Lorsque le gel s'est refroidi à une température d'environ 4 °C, de 10 à 12 fentes verticales sont pratiquées au moyen d'une spatule dans l'épaisseur du gel et dans le sens de la largeur, à 8 cm de son extrémité cathodique. Dans chaque fente, on insère un rectangle de papier whatmann n° 3 de 5 × 10 mm, imbibé d'environ 10 µl de l'extrait fraîchement décongelé d'un individu. Le gel est recouvert ensuite d'un film plastique sur lequel on dispose un bac de glace fondante. L'ensemble est alors relié à deux cuves contenant les électrodes et la solution tampon correspondant au système de migration choisi pour le gel, S5 ou S6. La migration se déroule horizontalement, en chambre froide, après avoir affiché sur un générateur à courant continu les valeurs maximales de voltage et de l'intensité, limitées respectivement à 250 volts ($E = 11$ V/cm) et 25 mA par gel.

Gel d'acrylamide.

Les migrations verticales sur gels de polyacrylamide ont été pratiquées au moyen de cellule Biorad modèle 220 (Biorad Ltd, Richmond, California, U.S.A.), permettant l'élec-

trophorèse simultanée de 40 échantillons et pour une épaisseur de gel de 0,75 mm. Deux méthodes A1 et A2 ont été mises en œuvre (Tabl. II). Le voltage et l'intensité ont été également limités à 250 volts ($E = 21$ V/cm) et 50 mA respectivement, excepté pour la méthode A2 où le voltage est poussé à 300 volts ($E = 25$ V/cm) durant la migration au travers du gel fin. Un générateur à courant pulsé (350 p/sec pour 250 volts, 500 p/sec pour 300 volts) a été également employé pour ce dernier type de migration.

Révélation.

Après une durée de migration fonction de chaque méthode (≈ 6 h pour S5 et S6 ; ≈ 4 h 1/2 pour A1 ; 3 h 1/2 pour A2), les gels sont colorés au moyen de solutions fraîchement préparées contenant en mélange l'ensemble des réactifs nécessaires à l'activité spécifique d'une enzyme. Les gels d'amidon, en raison de leur épaisseur, sont découpés au préalable en tranches de 1,7 mm d'épaisseur par un fil d'acier, permettant après une électrophorèse la révélation de 4 à 5 enzymes.

Systèmes enzymatiques.

A la suite de nombreux essais portant sur l'activité, le polymorphisme et la qualité des diagrammes d'une trentaine d'enzymes à l'aide de ces 4 méthodes de migration, neuf d'entre elles ont été retenues, dont les méthodes de migration optimales sont rappelées dans le tableau III. Les révélations enzymatiques employées ont été celles que Trouslot et Second [1980] ont adaptées de Shaw et Prasad [1970] : Mdh, Got ; de Brewer [1970] : Idh, Pgd, Pgm, Pgi ; de Pai *et al.* [1975] : Acp. La révélation des endopeptidases a été empruntée à Cardy *et al.* [1980]. Enfin, la coloration de la shikimate déshydrogénase dérive de celle de l'isocitrate déshydrogénase en remplaçant le substrat par du shikimate de sodium 0,003 M.

III. — INTERPRÉTATION GÉNÉTIQUE DES MARQUEURS ENZYMATIQUES

1. — Déterminisme.

Les zymogrammes les plus caractéristiques de chacun des neuf systèmes enzymatiques détectés à partir de l'ensemble du matériel végétal sont présentés sur les planches A et B. Ils ont permis, en connaissant les quelques règles simples de migration des enzymes oligomériques par électrophorèse, de formuler dans un premier temps les hypothèses les plus vraisemblables sur leur contrôle génétique. L'expression de 38 allèles gouvernés par 14 locus a pu être ainsi présumée.

A l'aide de 23 autofécondations et d'un croisement, ces hypothèses ont été éprouvées pour 8 locus en calculant et en testant la valeur du X^2 entre ségrégations observées et attendues, après avoir regroupé les classes à effectifs insuffisants (Tabl. IV). Pour les 6 autres locus, la cohérence de leur interprétation génétique a été simplement vérifiée en observant les génotypes dans les autofécondations : descendance homogène et identique au parent de départ dans le cas de l'autofécondation d'un génotype supposé homozygote ; descendance ségrégeant en 2 à 3 classes génotypiques dans le cas d'un hétérozygote.

L'ensemble des ségrégations observées, qu'elles aient pu être testées ou non, conduit à ne pas rejeter les modèles de déterminisme génétique énoncés initialement au simple vu

TABLEAU I. — Méthodes de migration sur gel d'amidon
(Migration methods on starch gel)

Méthodes (Methods)	S5 [Shaw & Prasad, 1970]	S6 [Poulik, 1957]
Concentration du gel (Gel concentration)	14 p. 100	12 p. 100
Tampons (Buffers)		
— gel :	Tris 0,009 M Acide citrique (Citric acid) 0,003 M pH \approx 7,0	Tris 0,076 M Acide citrique (Citric acid) 0,005 M pH \approx 8,7
— électrodes :	Tris 0,135 M Acide citrique (Citric acid) 0,043 M pH \approx 7,0	Acide borique (Boric acid) 0,3 M Soude (Sodium hydroxide) 0,06 M pH \approx 8,2

TABLEAU II. — Méthodes de migration sur gel de polyacrylamide
(Migration methods on polyacrylamide gel)

Méthodes (Methods)	A1	A2 [Ornstein, 1964]
Concentration		
Gel large (Stacking gel)		
acrylamide	3 p. 100	2,5 p. 100
bis-acrylamide	0,15 p. 100	0,625 p. 100
Gel fin (Running gel)		
acrylamide	12 p. 100	9 p. 100
bis-acrylamide	0,6 p. 100	0,158 p. 100
Tampons (Buffers)		
Gel large (Stacking gel)	Tampon commun (Common buffer) :	Tris (0,0615 M) HCl pH = 6,7
	Tris (0,0089 M) Borate (0,0089 M) E.D.T.A. (0,025 M) pH \approx 8,1	
Gel fin (Running gel)		Tris (0,376 M) HCl pH = 8,9
Electrodes		Tris (0,0069 M) Glycine (0,054 M) pH \approx 8,6

— La polymérisation des gels est catalysée par du persulfate d'ammonium (0,3 p. 100) et quelques gouttes de T.E.M.E.D., excepté pour le gel large de la méthode A2 où la polymérisation est assurée par de la riboflavine (0,5 mg pour 100 ml de gel) et l'action des U.V. d'un tube fluorescent (Polymerization of the gels is catalyzed by ammonium persulfate (0.3 p. 100) and a few drops of T.E.M.E.D., except for the stacking gel in method A2, where polymerization is brought about by riboflavin (0.5 mg/100 ml gel) and the action of U.V. in a fluorescent tube).

— Pour déposer les échantillons, un gel à encoches est coulé au-dessus du gel large. Sa composition peut être indifféremment celle du gel large ou du gel fin, sauf dans le cas de la méthode A2 où le tampon du gel à encoches doit être le même que celui du gel large (To deposit homogenates a sample gel is poured on top of the stacking gel. Its composition may be that of the stacking gel or the running gel, except in method A2, where the buffer of the sample gel must be the same as that of the stacking gel).

TABLEAU III. — Méthodes de migration utilisées pour l'analyse de la variabilité génétique du palmier à huile
par électrophorèse de neuf systèmes enzymatiques

(Migration methods used for analyzing genetic variability in oil palm by electrophoresis of nine enzyme systems)

Systèmes enzymatiques (Enzyme systems)	Abréviation (Abbreviation)	Code enzyme commission (Enzyme commission code)	Méthodes de migration (Migration methods)
Endopeptidase	Endo	3.4.11.	
Isocitrate déshydrogénase	Idh	1.1.1.42.	
Malate déshydrogénase	Mdh	1.1.1.37.	S5
Phosphatases acides cathodiques (Cathodal acid phosphatases)	Cath. Acp	3.1.3.2.	
Phosphoglucose mutase	Pgm	2.7.5.1.	
Shikimate déshydrogénase	Skdh	1.1.1.25.	
Phosphogluconate déshydrogénase	Pgd	1.1.1.44.	S6
Phosphoglucose isomérase	Pgi	5.3.1.9.	
Phosphatases acides anodiques (Anodal acid phosphatases)	An. Acp	3.1.3.2.	A1
Glutamate oxaloacétate transaminase	Got	2.6.1.1.	A2

(Les révélations n'ont porté que sur la partie anodique des gels, excepté dans le cas des phosphatases acides où la partie cathodique présentait également une activité enzymatique (Staining procedures only concerned the anodal part of the gels, except in the case of acid phosphatases, where the cathodal part also displayed enzyme activity)).

TABLEAU IV. — Hypothèses de contrôle génétique de neuf systèmes enzymatiques, testées sur des descendance en ségrégation

(Hypotheses of genetic control of nine enzyme systems, tested on segregated progenies)

Systèmes enzymatiques (Enzyme systems)	Locus (Loci)	Génotypes parentaux (Parental genotypes)		Ségrégation			
		Croisement (Cross)	Autofécondations (Selfs)	observée (observed)		attendue (expected)	
Got	A	A1A3 × A3A3	A1A3	A1A3 18	A3A3 17	1 : 1	0,03 NS
			A1A3	A1A1 7	A1A3 15	1 : 2 : 1	7,21 *
			A1A4	A1A1 2	A1A4 3	1 : 2 : 1	
			A3A4	A3A3 4	A3A4 9	1 : 2 : 1	
			A2A3	A2A2 1	A2A3 7	1 : 2 : 1	
	B		B2B3	B2B2 4	B2B3 19	1 : 2 : 1	2,73 NS
			B1B3	B1B1 2	B1B3 4	1 : 2 : 1	
					B3B3 1	1 : 2 : 1	
	Endo		A1A3	A1A1 0	A1A3 2	1 : 2 : 1	
					A3A3 2	1 : 2 : 1	
Idh			A1A3	A1A1 1	A1A3 2	1 : 2 : 1	
			A2A3	A2A2 6	A2A3 7	1 : 2 : 1	
Mdh	A		A1A2	A1A1 2	A1A2 5	1 : 2 : 1	
	B		B0B1	B0B0 18	<u>B0B1</u> 35	1 : 3	2,27 NS
	G	G1G1 × G1G2	G1G1	G1G1 15	G1G2 20	1 : 1	0,71 NS
			G1G2	G1G1 17	G1G2 29	1 : 2 : 1	0,29 NS
					G2G2 16	1 : 2 : 1	
Acp	An. B		B1B2	B1B1 0	B1B2 1	1 : 2 : 1	
	Cath.	A1A2 × A1A2		A1A1 8	A1A2 17	1 : 2 : 1	0,26 NS
			A1A2	A1A1 22	A1A2 51	1 : 2 : 1	2,66 NS
			A1A3	A1A1 4	A1A3 1	1 : 2 : 1	
					A3A3 0	1 : 2 : 1	
Pgd			A1A2	A1A1 0	A1A2 5	1 : 2 : 1	
Pgi		A1A3 × A3A3		A1A3 16	A3A3 19	1 : 1	0,26 NS
			A1A2	A1A1 3	A1A2 12	1 : 2 : 1	
			A1A3	A1A1 17	A1A3 31	1 : 2 : 1	0,14 NS
Pgm	A		A2A3	A2A2 7	A2A3 13	1 : 2 : 1	0,04 NS
			A1A3	A1A1 1	A1A3 0	1 : 2 : 1	
			A1A2	A1A1 0	A1A2 1	1 : 2 : 1	
	B		B1B2	B1B1 1	B1B2 2	1 : 2 : 1	
			B2B3	B2B2 4	B2B3 4	1 : 2 : 1	
					B3B3 2	1 : 2 : 1	
Skdh		A1A2 × A2A2		A1A2 17	A2A2 18	1 : 1	0,03 NS
			A1A2	A1A1 19	A1A2 23	1 : 2 : 1	5,34 NS

(La signification des tests du χ^2 est au seuil de 5 p. 100 — the significance of χ^2 tests is 5 p. 100.)

des différents zymogrammes possibles d'un système enzymatique. Le locus *Got A* présente cependant un X^2 significatif à la suite d'un excès d'homozygotes *A3A3* dans l'autofécondation d'un génotype *A1A3*. En raison d'un degré du linkage non négligeable entre ce locus et celui gouvernant la *Skdh* et parce que le X^2 a été calculé dans les deux cas à partir de la même autofécondation, l'écart observé au locus *Got A* se manifeste également par un écart important, quoique non significatif, au locus *Skdh*. Comme les zymogrammes de ces locus sont particulièrement clairs et que le croisement, faisant intervenir les mêmes allèles, montre des disjonctions parfaitement mendéliennes, il est vraisemblable que l'interprétation génétique ne soit pas à remettre en cause, mais que l'écart provienne d'un biais dans l'échantillonnage.

2. — Linkage.

Les tests X^2 d'indépendance entre locus enzymatiques n'ont pu être réalisés que pour les autofécondations et le croisement de deux arbres, *L2T* et *D10D*, en raison de leurs effectifs suffisants. De ce fait, sur les 91 couples où un test d'indépendance entre locus était envisageable, 11 seulement ont été effectués. Ils concernent six locus : *Got A*, *cath*, *Acp*, *Pgi*, *Skdh*, *Mdh B* et *G* et accessoirement le caractère de l'épaisseur de la coque du fruit dont le déterminisme a été considéré comme monogénique et diallélique (Sh^+ , Sh^-).

Le seul test possible de liaison entre caractère morphologique (épaisseur de la coque du fruit) et locus enzymatique (*cath*, *Acp*) s'est révélé non significatif ($r = 0,39 \pm 0,23$) alors que deux linkages sont clairement mis en évidence parmi les combinaisons entre locus enzymatiques. Ils font intervenir les locus *Got A* et *Skdh* d'une part et *cath*, *Acp* et *Mdh G* d'autre part. Les estimations du taux de recombinaison, directes dans le cas du croisement, ou selon la méthode du maximum de vraisemblance dans le cas de l'autofécondation, concordent bien et donnent pour les 2 linkages : $0,14 \pm 0,11$ et $0,05 \pm 0,05$ respectivement.

IV. — DISCUSSION

Le pollen s'est avéré un matériel particulièrement intéressant lors de cette première étude du polymorphisme enzymatique. L'activité y est élevée et se maintient d'une façon satisfaisante sur des échantillons récoltés et stockés à -20°C depuis parfois plus d'un an. L'action d'agents protéolytiques ou inhibiteurs qui viendraient altérer l'activité enzymatique des échantillons ou en compliquer l'extraction semble également ne pas se manifester chez le pollen.

L'aspect général des zymogrammes permet d'ajouter quelques remarques sur le contrôle génétique des systèmes enzymatiques.

Deux systèmes, *Endo* et *Skdh*, sont particulièrement simples, ils n'engagent qu'un seul locus où l'expression allélique se caractérise par une bande unique.

La *Got*, bien que mettant en jeu deux locus distincts, se rapproche également des systèmes précédents ; l'additivité des zymogrammes traduisant la codominance des allèles est exactement respectée de telle sorte que l'interprétation génétique est immédiate : les individus homozygotes présentent une seule bande tandis que les hétérozygotes en présentent deux. L'observation de zymogrammes à partir d'extraits de feuille a permis de conclure par ailleurs à une

structure moléculaire dimérique de la *Got*, c'est-à-dire constituée de deux chaînes polypeptidiques ou monomères (planche A). En effet, lorsque le locus *Got A* est à l'état hétérozygote, les zymogrammes observés à partir d'extraits foliaires se caractérisent en plus des deux bandes attendues par une troisième bande de mobilité intermédiaire. Cette bande supplémentaire résulte de l'association aléatoire des deux monomères distincts codés par les deux allèles présents au locus hétérozygote et correspond à la forme hétérodimérique de l'enzyme (Fig. 1). Cette forme moléculaire n'est possible que chez un tissu diploïde comme la feuille, en revanche, elle ne peut être réalisée dans un mélange de tissu haploïde comme le pollen car les deux monomères codés par chacun des deux allèles restent cloisonnés au niveau de chaque grain de pollen. La nature haploïde du pollen n'exclut pas cependant une dimérisation entre monomères codés par des locus distincts. Celle-ci n'a pourtant jamais été observée entre les locus *A* et *B* de la *Got* que ce soit à partir de pollen ou de feuille. Ce phénomène couramment signalé pour cette enzyme, est dû au fait que les formes moléculaires de l'enzyme codées par les deux locus sont cantonnées chacune dans des compartiments cellulaires différents, le cytosol et les mitochondries en l'occurrence, et que la dimérisation inter-locus est alors physiquement impossible.

La *Pgd*, de structure dimérique comme la *Got*, illustre au contraire le cas où la dimérisation entre deux locus distincts est réalisée. L'hypothèse de deux locus *A* et *B*, l'un polymorphe pour trois allèles *A0*, *A1* et *A2*, et l'autre monomorphe, permet d'expliquer de façon satisfaisante les quatre types de zymogrammes rencontrés (Planche B et Fig. 2). Chez *Pinus banksiana*, O'Malley et Guries [1983] montrent aussi à partir de gamétophytes haploïdes, ces types de zymogramme complexe de la *Pgd* mettant en jeu 2 locus. Devant leur très faible fréquence d'apparition et l'indépendance des locus, les auteurs ont été amenés à supposer qu'une translocation chromosomique hétérozygote devait en être responsable. Dans le cas du palmier, le caractère uniformément répandu de ces zymogrammes traduirait plutôt l'existence d'une véritable duplication génique, présente à l'état fixé chez tous les individus. Comme l'un des locus est monomorphe, il n'a pas été possible de déterminer le degré de linkage entre les locus et de préjuger des événements cytogénétiques à l'origine de cette duplication. Cependant, le fait que les palmiers gardent tous aujourd'hui une même trace de remaniements chromosomiques confirme, si besoin était, la nature monophylétique de l'origine de cette espèce. Par ailleurs, la présence à l'un des locus d'un allèle considéré comme nul et d'un allèle (*A2*), dont l'activité enzymatique potentielle semble supérieure à celle de l'autre allèle actif (*A1*) [Koutou, 1983], se rapproche remarquablement de la situation rencontrée pour la *Pgi* dans le genre *Clarkia* [Gottlieb, 1977]. Les espèces de ce genre ont acquis en effet par duplication de l'un des deux locus ancestraux, un troisième locus où l'on trouve à côté d'un allèle nul, trois allèles dont les constantes de Michaelis sont très sensiblement différentes de celles mesurées chez les allèles des locus primitifs. Comme le souligne Gottlieb [1977], une telle situation constituerait un argument en faveur de la théorie de l'évolution des gènes par duplication [Ohno, 1970]. Selon celle-ci en effet, un gène, en maintenant sa fonction d'origine, permet à celui qui lui est dupliqué de se soustraire à l'action de la sélection conservatrice et d'accumuler de nombreuses mutations. Il n'est donc pas étonnant de trouver à ces locus, un grand nombre d'allèles nuls mais aussi des allèles codant

pour des enzymes dont les propriétés physico-chimiques diffèrent de celles des enzymes codées par les allèles du locus primitif.

Les cinq autres systèmes enzymatiques présentent des zymogrammes plus complexes, soit parce qu'ils mettent en cause plusieurs locus, soit parce que des isozymes secondaires, c'est-à-dire des modifications post-transcriptionnelles de l'expression d'un seul et même gène, ne viennent plus caractériser chaque allèle par une bande unique mais par plusieurs bandes, souvent variables dans leur nombre et l'intensité de leur coloration. Ces deux causes n'étant pas exclusives, elles donnent lieu à des zymogrammes plus délicats à interpréter. L'observation de descendances est alors particulièrement utile pour faire la part entre les deux phénomènes et déterminer comment se matérialise par électrophorèse la variation génétique des systèmes enzymatiques.

Dans le cas de la Pgm et de l'Idh, l'interprétation est restée facile à cause du petit nombre de bandes caractéristiques des allèles (Pgm) ou de leur coloration très intense (Idh).

Chez la Pgi, les zymogrammes observés pouvaient faire penser aussi à une situation de gènes dupliqués, analogue à celle rencontrée chez la Pgd. La duplication des gènes codant pour la Pgi a déjà été signalée chez d'autres végétaux, que les locus soient liés comme chez le dactyle [Lumaret, 1981], ou indépendants comme chez le riz [Trousnot et Second, 1980] ou les espèces du genre *Clarkia* déjà mentionnées. Une difficulté a été cependant la variation que présentaient les zymogrammes des allèles, ceux-ci pouvant passer d'une bande très intense suivie de quelques bandes faibles, à deux ou trois bandes d'égale intensité. Il semble bien que l'âge des extraits, la qualité du pollen, la nature du tampon d'extraction et de migration interviennent dans l'instabilité des zymogrammes, liée alors vraisemblablement à une dénaturation partielle de l'enzyme. Dans ces conditions, il a été jugé préférable d'interpréter les zymogrammes des différentes formes alléliques en considérant uniquement la première bande comme caractéristique et les 2 ou 3 bandes plus rapides comme des isozymes secondaires. Chez le café, Berthou *et al.* [1980] signalent aussi une expression allélique de la Pgi sous la forme de trois bandes inséparables mais sans noter toutefois d'importantes variations de leur intensité. Comme pour la Got, aucune dimérisation entre le locus A et le locus B monomorphe de la Pgi n'a été observée, ce qui permet de supposer aussi que les produits des deux locus restent séparés dans la cellule, vraisemblablement dans le cytosol et les plastides.

Chez les phosphatases acides où la non-spécificité du substrat pouvait autoriser l'expression de plusieurs locus, le faible polymorphisme manifesté par la partie anodique du gel a conduit cependant à considérer pour l'instant les bandes lentes comme des isozymes secondaires d'un locus unique.

L'interprétation de la Mdh a été également rendue difficile par le grand nombre de bandes. Trois zones, attribuées à l'expression de trois locus, ont été découpées dans les zymogrammes au vu des ségrégations observées dans les descendances. Si le déterminisme du locus A paraît acquis, l'interprétation du locus B a dû faire intervenir l'existence d'un allèle nul ou récessif, ce qui implique la non-détection des génotypes hétérozygotes, et celle du locus G repose sur l'appréciation délicate de l'épaisseur de la bande n° 11.

D'une façon générale, il importe de souligner l'aspect encore partiel et provisoire de cette première analyse du

contrôle génétique des marqueurs enzymatiques, et ce pour des raisons intervenant à différents niveaux :

Niveau méthodologique.

L'allèle A3 du locus cath. Acp par exemple, n'a été repéré qu'une seule fois et sa proximité de l'allèle A2 peut faire douter de son individualité, tout au moins dans les limites des techniques d'électrophorèse utilisées.

Niveau de l'interprétation.

Les locus B et G de la Mdh résultent d'une interprétation globale de zymogrammes complexes. Si celle-ci s'avère compatible avec les ségrégations observées jusqu'à maintenant, il est possible que de nouvelles disjonctions la remettent en cause ultérieurement et aboutissent à une méthode d'interprétation génétique plus élaborée.

Niveau de l'échantillonnage.

L'échantillonnage encore insuffisant dans chacune des origines du matériel analysé jusqu'à maintenant implique que tout le polymorphisme enzymatique n'a sans doute pas été mis en évidence. De récentes observations sur du matériel d'origine camerounaise ont permis ainsi de repérer deux nouveaux allèles (Endo A'2 et An. B3 Acp) et de supposer l'existence d'un autre locus polymorphe (An. A Acp) dans les variations d'intensité des bandes lentes des phosphatases acides anodiques.

CONCLUSIONS

Le tableau V fait la synthèse de la génétique formelle des neuf systèmes enzymatiques. Cette analyse nécessiterait cependant d'être poursuivie sur du matériel d'origine plus diversifiée ainsi que sur d'autres descendances. En effet, si pour la majorité des systèmes enzymatiques, le contrôle génétique semble clair et peut se limiter ultérieurement à la détection de nouveaux allèles, celui de la Mdh, de la Pgi et des Acp est encore peu satisfaisant et demanderait à être approfondi.



L'étude du polymorphisme enzymatique à partir d'extraits végétatifs comme la feuille constituerait une méthode élégante pour compléter l'analyse du contrôle génétique élaborée à partir du pollen. Ce serait également une façon intéressante d'aborder la régulation de quelques gènes de structure dans des tissus de nature et de ploïdie différentes, ainsi que la structure moléculaire des enzymes codées par ces gènes. Le transfert des techniques d'électrophorèse du pollen à la feuille trouverait aussi tout son intérêt pour déterminer les individus à un stade précoce ainsi que pour évaluer le matériel de prospection dont la récolte du pollen est difficilement envisageable.

Le linkage entre locus enzymatiques n'a pu être étudié que partiellement pour six locus, pourtant, la mise en évidence de deux liaisons incite à en poursuivre la recherche. Le linkage offre en effet un moyen supplémentaire de comparaison des populations par leurs déséquilibres gamétiques, bien que cela semble n'avoir été que difficilement montré jusqu'à présent chez les plantes allogames [Brown, 1979].

Une analyse du contrôle génétique de marqueurs enzymatiques mériterait aussi d'être entreprise chez *E. melanococca*, palmier d'origine sud-américaine. Plusieurs niveaux d'évaluation de l'homologie génétique sont désormais disponibles grâce aux résultats acquis sur *E. guineensis* : les

TABLEAU V. — Synthèse des études de génétique formelle pour neuf systèmes enzymatiques mis en évidence par électrophorèse de pollen chez le palmier à huile.

(Summary of formal genetic studies for nine enzyme systems revealed by electrophoresis of pollen in oil palm)

Systèmes enzymatiques	Skdh	Got		Endo	Idh	Mdh			Acp		Pgd	Pgi	Pgm		
Locus (<i>Loci</i>)	A	A	B	A	A	A	B	G	Cath.	An.A	An.B	A*	A	A	B
Allèles (<i>Alleles</i>)	A1 A2	A1 A2 A3 A4	B1 B2 B3	A1 A2 A2 A3	A1 A2 A3	A1 A2	B0 B1	G1 G2	A1 A2 A3		B1 B2 B3	A0 A1 A2	A1 A2 A3	A1 A2 A3	B1 B2 B3
Linkage															
Taux de recombinaison (<i>Recombination value</i>)	0,14 ± 0,11			0,05 ± 0,05											

- En italiques : nouveaux locus polymorphes ou allèles (*In italics = new polymorphic loci or alleles*).
- (*) : Duplication génique (*Genic duplication*).

trente-huit allèles des 14 locus, la duplication génique de la Pgd, les deux linkages Got A — Skdh et Cath. Acp — Mdh G. Ils permettraient d'appréhender d'une façon plus générale l'organisation des gènes dans le genre *Elaeis* et le degré de divergence de ces deux espèces. C'est un aspect fondamental de l'étude génétique d'une plante, mais qui peut avoir aussi des conséquences sur son amélioration : la recombinaison génétique par exemple est une donnée essentielle pour exploiter la variabilité génétique d'une espèce et conduire de façon efficace un schéma de sélection ; la réussite d'un hybride interspécifique comme celui de *E. guineensis* par *E. melanococca* peut dépendre étroite-

ment aussi de la structure génique des deux génomes mis en présence.

Certainement incomplète, cette étude permet cependant de décrire et de comparer des individus par leur génotype à 14 locus et constitue un premier outil pour mieux comprendre l'organisation de la variabilité génétique chez le palmier.

Il est clair également que l'analyse du déterminisme génétique ne se limite pas non plus à un simple préliminaire, mais présente aussi un intérêt en elle-même par une meilleure connaissance de la structure et du fonctionnement des gènes d'une plante.

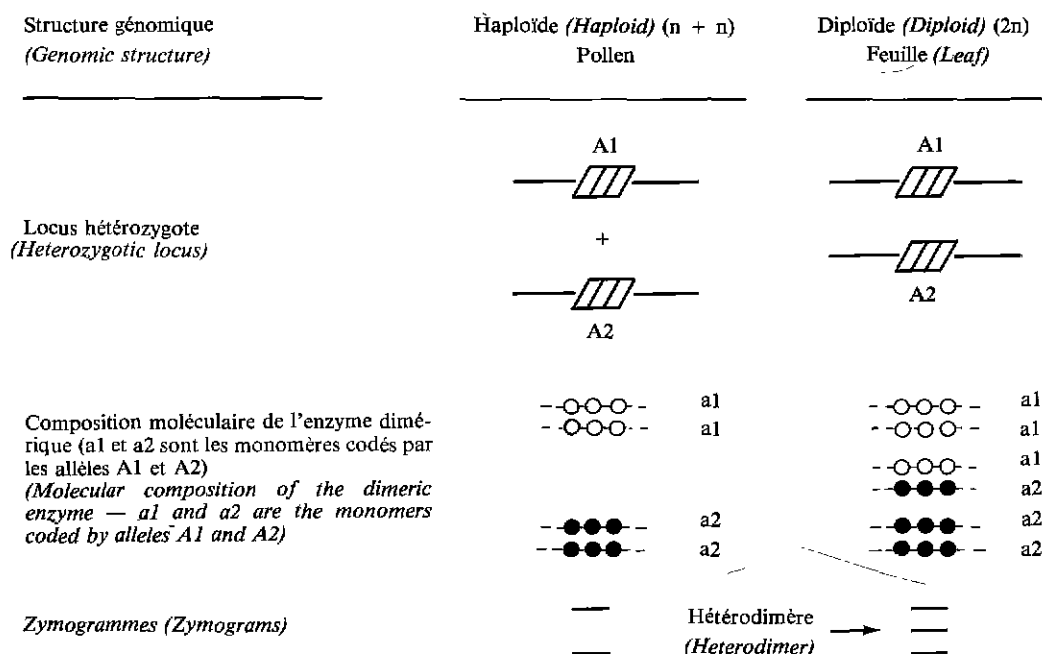
BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERTHOU F., TROUSLOT P., HAMON S., VEDEL F., QUETIER F. (1980). — Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers : variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages — variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces : *C. canephora*, *C. eugenoides* et *C. arabica*. *Café Cacao Thé*, 24, N° 4, p. 313-325.
- [2] BREWER G. J. (1970). — *An introduction to isozymes techniques*. Academic Press, New York, San Francisco, London, 185 p.
- [3] BROWN A. H. D. (1979). — Enzyme polymorphism in plant. *Theor. Popul. Biol.*, 15, p. 1-42.
- [4] CARDY B. J., STUBER C. W., GOODMAN M. M. (1980). — Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). *Institute of Statistics Mimeogr. Ser.*, 1317, p. 1-31.
- [5] GASCON J. P., BERCHOUX C. de (1964). — Caractéristiques de la production d'*Elaeis guineensis* (Jacq.) de diverses origines et de leurs croisements. Application à la sélection du palmier à huile. *Oléagineux*, 19, N° 2, p. 75-84.
- [6] GHESQUIERE M. (1983). — Contribution à l'étude de la variabilité génétique du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). Le polymorphisme enzymatique. *Thèse Doc. Ing., Univ. Paris XI, Centre Orsay, France*, 146 p.
- [7] GOTTLIEB L. D. (1977). — Evidence for duplication and divergence of the structural gene for phosphoglucosomerase in diploid species of *Clarkia*. *Genetics*, 86, p. 289-307.
- [8] HARRIS H. (1966). — Enzyme polymorphisms in man. *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 164 p. 298-310.
- [9] JONES J. S. (1980). — How much genetic variation ? *Nature*, 288, p. 10-11.
- [10] KOUTOU A. (1983). — Mesure de deux activités enzymatiques liées à la lipogenèse dans le fruit du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *D.E.A.A., Univ. Montpellier, France*, 69 p.
- [11] LEWONTIN R. C., HUBBY J. L. (1966). — A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. — Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54, p. 595-609.
- [12] LEWONTIN R. C. (1974). — *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press, New York and London, 346 p.
- [13] LUMARET R. (1981). — Structure génétique d'un complexe polyploïde : *Dactylis glomerata* L. Relations entre le polymorphisme enzymatique et certains aspects de la biologie, de l'écologie et de l'évolution de l'espèce. *Thèse d'Etat, Univ. Montpellier, France*, 168 p.
- [14] MEUNIER J., GASCON J. P. (1972). — Le schéma général d'amélioration du palmier à huile à l'I.R.H.O. *Oléagineux*, 21, N° 1, p. 1-12.

(suite p. 568)

Structure moléculaire enzymatique — Niveaux de ploïdie — Electrophorèse
(Enzyme molecular structure — Levels of ploidy — Electrophoresis)

FIG. 1 — Le cas de la Got' : dimérisation à un locus hétérozygote.
(The case of Got' : Dimerization at one heterozygotic locus)



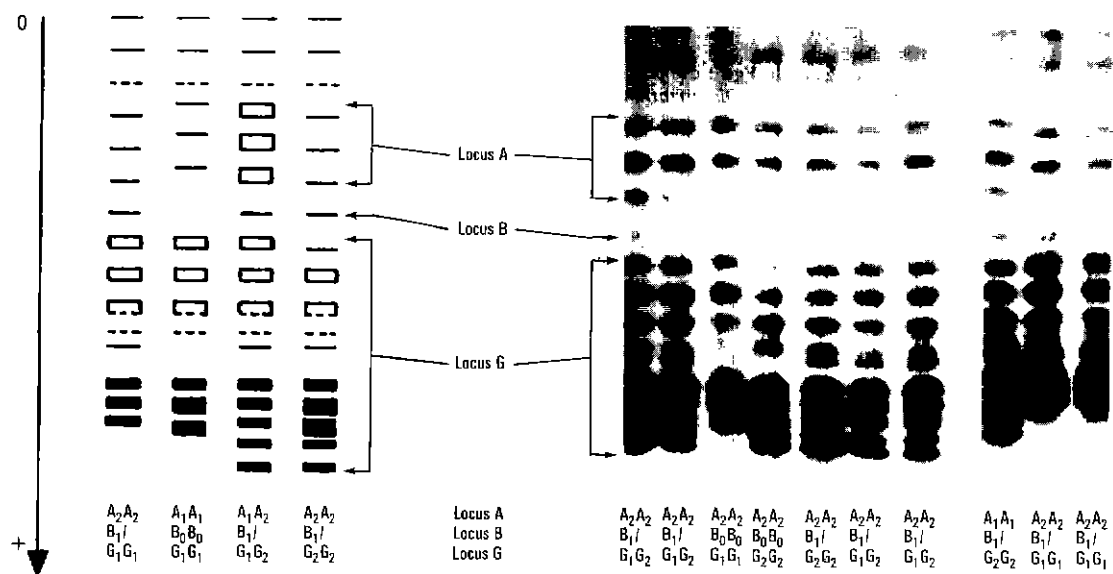
Dans le cas d'une enzyme dimérique, c'est-à-dire nécessitant l'association de deux monomères pour être active, et codée par un locus hétérozygote, la structure moléculaire hétérodimérique de l'enzyme n'est pas formée chez le pollen en raison de son caractère d'haploïde en mélange, tandis qu'elle apparaît chez un tissu diploïde comme la feuille.

(In the case of a dimeric enzyme i.e., necessitating the association of two monomers to be active, and coded by a heterozygotic locus, the heterodimeric molecular structure of the enzyme is not formed in pollen on account of its haploid character in mixture, whereas it does appear in a diploid tissue such as the leaf).

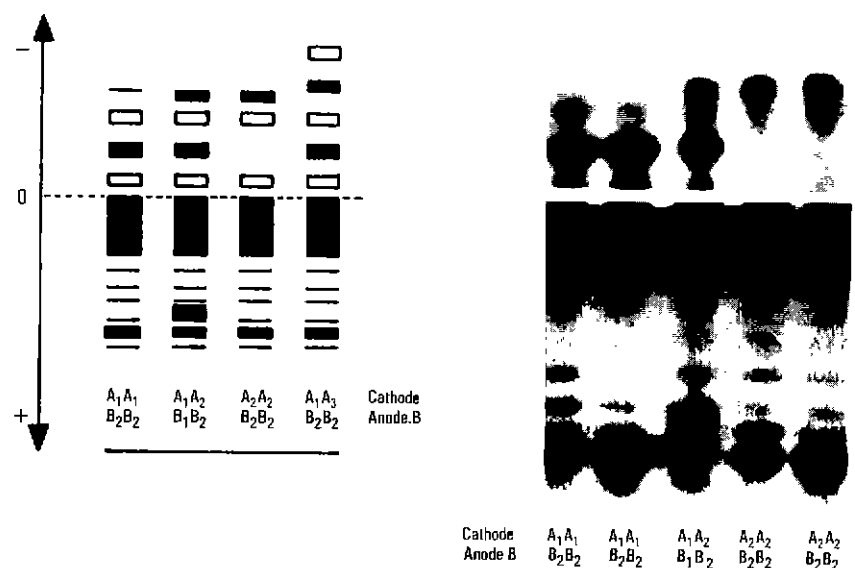
BIBLIOGRAPHIE (suite)

- [15] OHNO S. (1970). — *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag, New York.
- [16] O'MALLEY D. M., GURIES R. P. (1983). — Detection of a translocated 6-phosphogluconate dehydrogenase locus in Jack Pine. *Isozyme Bull.*, 16, p. 57.
- [17] ORNSTEIN L. (1964). — Disc electrophoresis. I. — Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, p. 321-349.
- [18] PAI C., ENDO T., OKA H. I. (1975). — Genic analysis for acid phosphatase isozymes in *Oryza perennis* and *O. sativa*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 17, p. 637-650.
- [19] POULIK M. D. (1957). — Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, 180, p. 1477-1478.
- [20] SHAW C. R., PRASAD R. (1970). — Starch gel electrophoresis of enzymes, a compilation of recipes. *Biochem. Genetics*, 4, p. 297-320.
- [21] SMITHIES O. (1955). — Zone electrophoresis in starch gels. Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61, p. 629-641.
- [22] TROUSLOT P., SECOND G. (1980). — Technique d'électrophorèse en gel d'amidon appliquée à l'étude de quatorze enzymes de riz. In : *Electrophorèse d'enzymes de riz (Oryza spp.)*, Travaux et documents O.R.S.T.O.M., 120, Paris, 88 p.

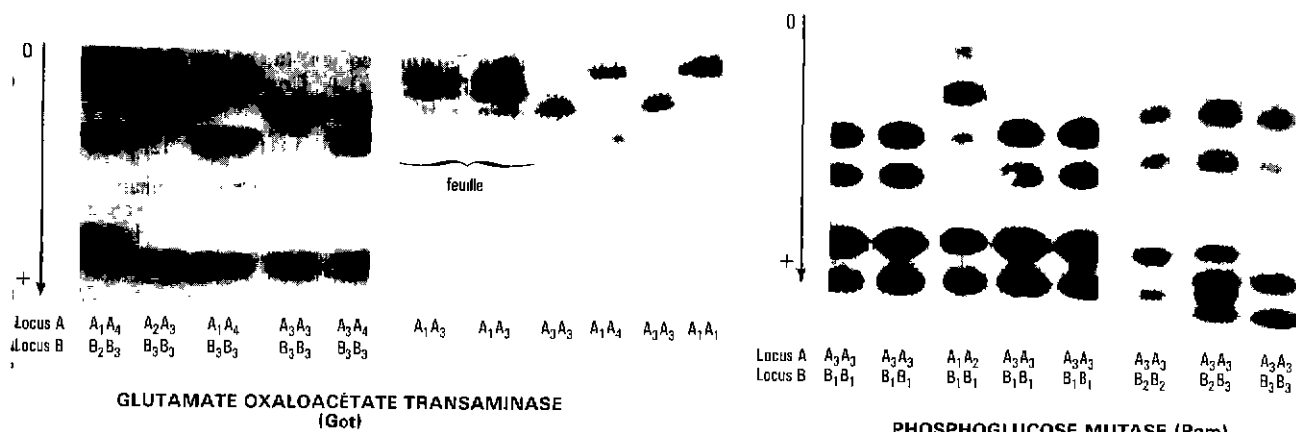
PLANCHE A



MALATE DÉSHYDROGÉNASE (Mdh)

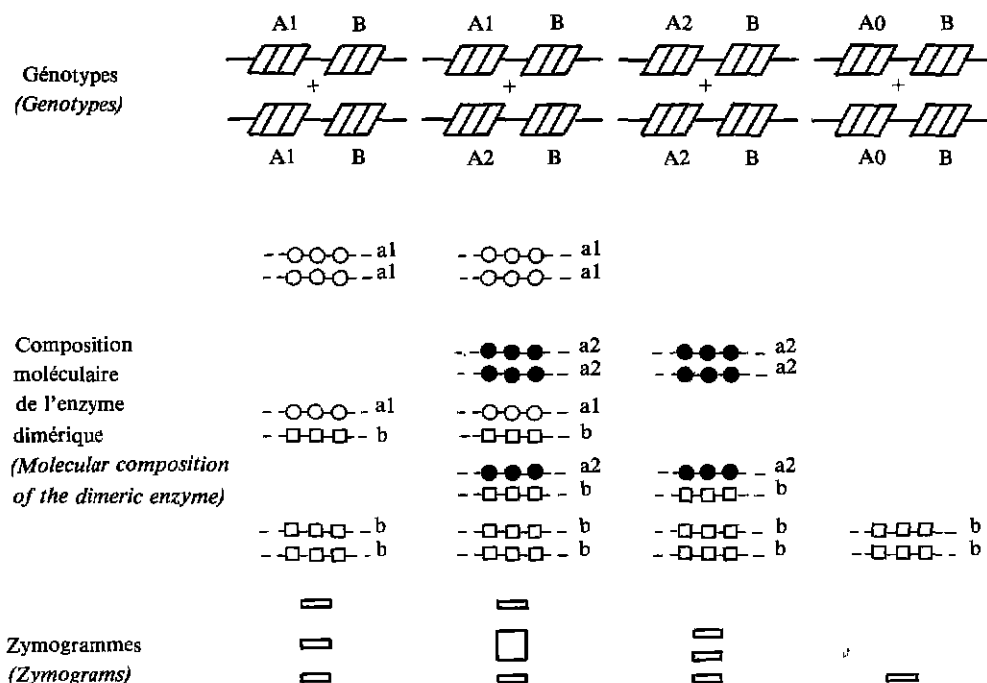


PHOSPHATASES ACIDES (Acp)



Structure moléculaire enzymatique — Niveaux de ploïdie — Electrophorèse
(Enzyme molecular structure — Levels of ploidy — Electrophoresis)

FIG. 2. — Le cas de la Pgd : dimérisation dans le cas de deux loci.
(The case of Pgd : Dimerization in the case of two loci)



Comme dans le cas de la Got, l'hétérodimère au locus A n'est pas réalisé chez le pollen pour les hétérozygotes A1A2, alors qu'il est toujours formé entre les loci A et B, donnant systématiquement lieu à des zymogrammes à 3 bandes pour les homozygotes A1A1BB et A2A2BB. La bande intermédiaire épaisse du génotype A1A2 est interprétée théoriquement comme la juxtaposition des deux hétérodimères interlocus a1b et a2b avec l'homodimère a2a2. D'autre part, si le locus A se trouve être homozygote pour un allèle inactif (A0), le zymogramme qui en résulte ne présentera plus 3 bandes mais une bande unique, correspondant à l'homodimère pour le seul locus homozygote actif (B).

(As in the case of Got, the heterodimer at locus A is not formed in pollen for heterozygotes A1A2, whereas it is always formed between loci A and B, giving rise systematically to three-band zymograms for homozygotes A1A1BB and A2A2BB. The thick intermediate band of genotype A1A2 is theoretically interpreted as the juxtaposition of the two interlocus heterodimers a1b and a2b with the homodimer a2a2. Also, if locus A is homozygotic for an inactive allele (A0), the resulting zymogram will no longer display three bands, but a single band, corresponding to the homodimer for the only active homozygotic locus (B)).

SUMMARY

Enzyme polymorphism in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). I. — Genetic control of nine enzyme systems.

M. GHESQUIERE, *Oléagineux*, 1984, 39, N° 12, p. 561-574.

A study of enzyme polymorphism was undertaken to estimate genetic variability among several origins of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). The electrophoretic techniques used employed the classic methods of migration and staining of enzymes in starch or polyacrylamide gels. Nine enzyme systems were thus analyzed from pollen homogenates. By observing different selfs and one cross, it was concluded that thirty-eight alleles existed, governed by fourteen polymorphic loci, two couples of which are closely linked.

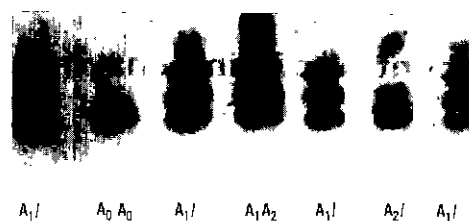
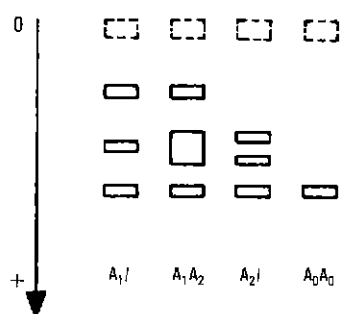
RESUMEN

Polimorfismo enzimático en la palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.). I. — Control genético de nueve sistemas enzimáticos.

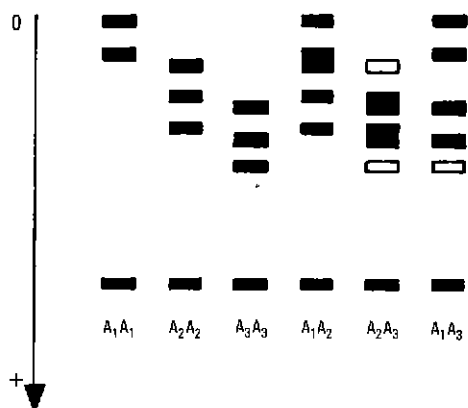
M. GHESQUIERE, *Oléagineux*, 1984, 39, N° 12, p. 561-574.

Se emprendió un estudio del polimorfismo enzimático para evaluar la variabilidad genética y su organización entre algunos orígenes de la palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.). Las técnicas de electroforesis que se utilizó recurrieron a los métodos clásicos de migración y revelación de enzimas en geles de almidón o poliácridamido. Así se analizó nueve sistemas enzimáticos a partir de extractos de polen. La observación de diferentes autofecundaciones y de un cruzamiento permitió llegar a la conclusión de que existen treinta y ocho alelos, regidos por catorce loci polimorfos, dos pares de los cuales se hallan estrechamente ligados.

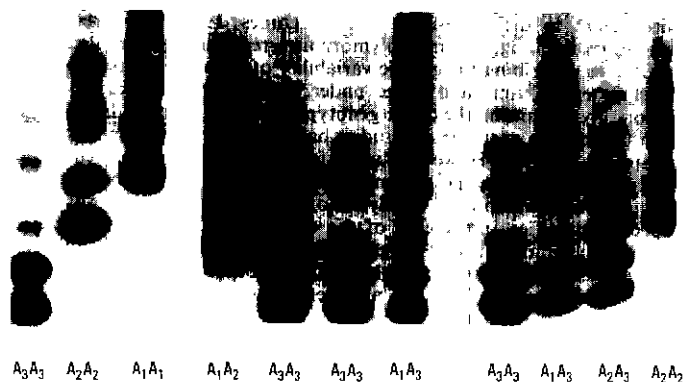
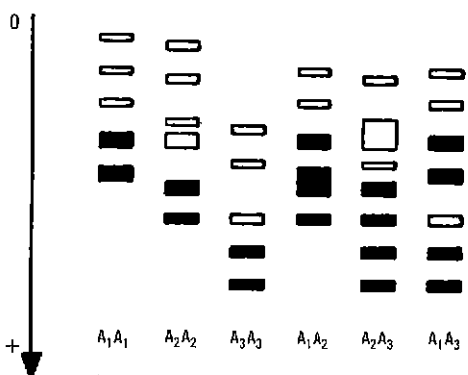
PLANCHE B



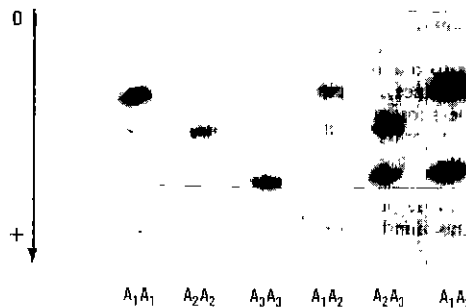
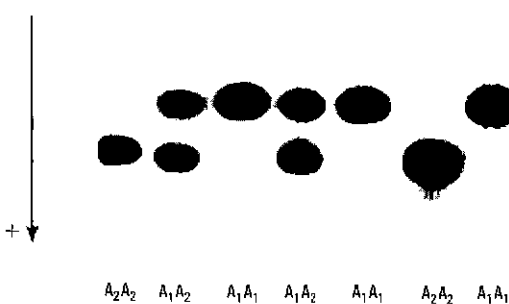
PHOSPHOGLUCONATE DÉSHYDROGÉNASE (PgD)



PHOSPHOGLUCOSE ISOMÉRISE (Pgi)



ISOCITRATE DÉSHYDROGÉNASE (Idh)



SHIKIMATE DÉSHYDROGÉNASE (Skdh)

ENDOPEPTIDASES (Endo.)

Enzyme polymorphism in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

I. — Genetic control of nine enzyme systems

M. GHESQUIÈRE (1)

INTRODUCTION

Electrophoresis consists of separating in a liquid or porous medium molecules charged in an electric field. In the case of proteins, and more especially in that of soluble enzymes, electrophoresis, by differences in migration, reveals multiple forms of the same enzyme, isozymes, possessing the same catalytic function, but differing considerably in their electric charge and molecular weight. Since the differences in migration observed are directly linked to the amino acid constitution of the enzymes, they are attributed to modifications in the nucleotide sequences of the genes coding for these enzymes, i.e., to allelic substitutions of these genes.

With the development of this technique in the 1950s, mainly thanks to Smithies [1955], who introduced the first analytical electrophoresis on starch gel, a particularly interesting tool was placed at the disposal of population geneticists. It would now be possible to know the exact genotype of sample individuals taken from populations, and estimate their genetic variability by rates of polymorphism and heterozygosity [Lewontin, 1974].

A fundamental step in the use of this technique was made by Lewontin and Hubby [1966] on *Drosophila*, and by Harris [1966] in man, by showing the importance of the enzyme polymorphism displayed by natural populations. The evolutionary interpretation of genetic variability revealed by electrophoresis is still subject to much controversy, since one of the major difficulties is estimating what is the real level of this variability and its representativeness with regard to the rest of the genome [Jones, 1982]. However, beyond its meaning, enzyme polymorphism remains an unrivalled method of describing the genetic variability of populations and its development in time and space under the influence of various factors, by permitting the direct genotypic marking of individuals.

In the last ten years, many studies have been performed in this regard on plants. However, very few data exist at present concerning the enzyme polymorphism of cultivated tropical plants. This method of analysis of genetic variability was especially justified in the case of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), a perennial, strictly allogamous plant endemic to the entire Guinean zone of West Africa. Indeed, the conditions specific to its genetic improvement made a better knowledge of its genetic variability and its structure necessary. The first attempts at oil palm improvement date from the beginning of the century, but it was not until 1957 that a genetically-based strategy was adopted by the I.R.H.O., using a programme of recurrent reciprocal selection [Meunier and Gascon, 1972]. This selection scheme is based on crosses between two groups of palms composed of different origins, for which Gascon and de Berchoux [1964] had showed the superiority of annual oil production compared to intra-origin crosses. However, the constraints inherent to the biological characteristics of the oil palm : perenniality, length of cycle, leaf bulk... limit at present the possibilities of introducing and evaluating new material for breeding. Also, the attribution of an origin of palms to one or the other group of the scheme is of fundamental importance, since it conditions the inter-origin crosses that will be subsequently performed, and the chances of obtaining valuable hybrids. Genetic variability and relationships between origins thus represent two essential aspects of oil palm improvement.

The study of enzyme polymorphism in oil palm has therefore been initiated in this mind [Ghesquière, 1983] ; as a preliminary, the object of this article is to analyze the genetic control of the enzyme markers revealed by electrophoresis.

I. — MATERIAL

Electrophoresis was performed on 252 trees, divided into 40 progenies, with four main geographical origins : Indonesia-Malaysia, Angola, Zaire and the Ivory Coast. These mainly consisted of trees that had been used as parents during the I.R.H.O.'s first breeding cycle (La Mé, Yangambi, Sibiti, Deli), and of more recently-investigated palms (Yocoboué, Angola). Selfs and a cross of some of these trees also enabled the validity of the genetic control of the enzyme markers to be tested.

Electrophoretic analyses were performed on samples of pollen collected and conditioned by the La Mé research station and the Robert Michaux experimental plantation (Ivory Coast), in exactly the same way as that used for artificial pollination.

II. — METHODS

Extraction.

Pollen extractions were performed for one minute using a 1-ml Kontes potter placed in melting ice. A Tris-HCl solution of 0.1 M, at pH 7.2, in a ratio of 120 mg of pollen/ml of solution, was used as an extraction buffer. After crushing, the samples were centrifuged in controlled temperature (4 °C) at 49,000 g for 20 minutes. The supernatant was then divided among Eppendorf tubes at a rate of 25 µl per tube, and immediately frozen at - 20 °C.

Migration.

Four methods of migration requiring starch or polyacrylamide gels were used.

Starch gel.

Gels were prepared in the usual way, by bringing to the boil a 12 or 14 p. 100 starch solution (Connaught Laboratories Limited, Willowdale, Ontario, Canada) in the appropriate buffer (Table I). After degassing with a water pump, the starch was poured into altuglass trays, 23 × 8 × 0.9 cm. When the gel had cooled to a temperature of about 4 °C, 10-12 vertical slots were made through the gel, widthwise, using a spatula, 8 cm from its cathodal end.

Into each slot was inserted a rectangle of No. 3 Whatmann paper, 5 × 10 mm, soaked in about 10 µl of the freshly-defrosted homogenate from one individual. The gel was then covered with a plastic film, on which was placed a container of melting ice. The unit was then connected to two trays containing the electrodes and the buffer solution corresponding to the migration system chosen for the gel, S5 or S6. Migration took place horizontally, in a cold room, after displaying on a continuous current generator the maximum values for voltage and intensity, limited, respectively, to 250 volts (E = 11 V/cm) and 25 mA per gel.

Acrylamide gel.

Vertical migrations on polyacrylamide gels were performed using a Biorad model 220 cell (Biorad Ltd., Richmond, California, U.S.A.), allowing the simultaneous electrophoresis of 40 samples for a gel 0.75 mm thick. Two methods, A1 and A2, were used (Table II). Voltage and intensity were also limited to 250 volts (E = 21 V/cm) and 50 mA, respectively, except for method A2, where the voltage was increased to 300 volts (E = 25 V/cm) during migration through the running gel. A pulsed

(1) Electrophoresis Laboratory, GERDAT, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

current generator (350 p/sec for 250 volts, 500 p/sec for 300 volts) was also used for the latter type of migration.

Staining-procedure.

After a migration time depending on each method (≈ 6 h for S5 and S6; ≈ 4 1/2 h for A1; 3 1/2 h for A2), the gels were stained using freshly-prepared solutions containing a mixture of the reagents necessary to the specific activity of an enzyme. On account of their thickness, starch gels were first cut into slices 1.7 mm thick using a steel wire, enabling four to five enzymes to be observed after electrophoresis.

Enzyme systems.

After numerous experiments concerning the activity, polymorphism and banding pattern quality of about thirty enzymes using these four methods of migration, nine were chosen, and their optimal migration methods are resumed in Table III. The enzyme staining procedure used were those adapted by Trouslot and Second [1980] from Shaw and Prasad [1970]: Mdh, Got; from Brewer [1970]: Idh, Pgd, Pgm, Pgi; and from Pai *et al.* [1975]: Acp. The staining method of endopeptidases was taken from Cardy *et al.* [1980]. Finally, the colouring of shikimate dehydrogenase was derived from that of isocitrate dehydrogenase, by replacing the substrate with 0.003 M sodium shikimate.

III. — GENETIC INTERPRETATION OF ENZYME MARKERS

1. — Genetic control.

The most characteristic zymograms of each of the nine enzyme systems detected in the material as a whole are presented in plates A and B. Using these, and knowing the few simple rules governing the migration of oligomeric enzymes by electrophoresis, it was possible, for a start, to formulate the most likely hypotheses concerning their genetic control. In this way, the expression of 38 alleles governed by 14 loci could be presumed.

Using 23 selfs and one cross, these hypotheses were tested for 8 loci, by calculating and testing the value of X^2 between observed and expected segregations, after regrouping classes with insufficient numbers of members (Table IV). For the other six loci, the consistency of their genetic interpretation was simply checked by observing genotypes in selfs: homogeneous progeny and identical with the original parent in the case of selfing of a supposedly homozygotic genotype; progeny segregating into two or three genotypic classes in the case of a heterozygote.

As a whole, the segregations observed, whether they could be tested or not, lead us not to reject the models of genetic control initially formulated simply by looking at the different possible zymograms of an enzyme system. However, locus Got A presents a significant X^2 following an excess of A3A3 in the self of an A1A3 genotype. Due to a not inconsiderable degree of linkage between this locus and that governing Skdh, and because the X^2 was calculated in both cases from the same self, the deviation observed in locus Got A also appears as a considerable though non-significant, deviation in locus Skdh. As the zymograms for these loci are particularly clear, and since the cross, involving the same alleles, shows perfectly Mendelian disjunctions, it is likely, not that the genetic interpretation should be questioned, but that the deviation stems from a bias in sampling.

2. — Linkage.

It was only possible to perform X^2 independence tests between enzyme loci for the selfs and the cross between two trees, L2T and D10D, since their numbers were sufficient. For this reason, out of the 91 couples for which an inter-locus independence test could have been envisaged, only 11 were performed. They concern six loci: Got A, cath, Acp, Pgi, Skdh, Mdh B and G, and incidentally the character of thickness of fruit shell, whose genetic control has been considered monogenic and diallelic (Sh^+ , Sh^-).

The only possible linkage test between morphological character (thickness of fruit shell) and enzyme locus (cath, Acp) proved non-significant ($r = 0.39 \pm 0.23$), whereas two linkages are clearly revealed among the combinations between enzyme loci. They involve loci Got A and Skdh on the one hand, and cath, Acp and Mdh G on the other. Estimates of the recombination value, direct for the cross, or using the method of maximum likelihood for selfs, are in good agreement and for the 2 linkages give: 0.14 ± 0.11 and 0.05 ± 0.05 , respectively.

IV. — DISCUSSION

Pollen proved to be a particularly interesting material in this first study of enzyme polymorphism. Activity in it is high, and is maintained satisfactorily in samples collected and stocked at -20°C , sometimes for more than a year. Also, there appears to be no action in pollen of proteolytic or inhibitory agents that may alter the enzyme activity of samples or complicate their extraction.

The general appearance of the zymograms enables us to add a few remarks about the genetic control of enzyme systems.

Two systems, Endo and Skdh, are particularly simple. They engage only one locus, where allelic expression is characterized by a single band.

Although it involves two distinct loci, Got is also close to the aforementioned systems; the additivity of the zymograms revealing the codominance of alleles is exactly respected, in such a way that genetic interpretation is immediate: homozygotic individuals display a single band, whereas heterozygotes display two. On the other hand, the observation of zymograms from leaf extracts has enabled to conclude that Got has a dimeric molecular structure, i.e., made up of two polypeptide or monomeric chains (plate A). Indeed, when locus Got A is in the heterozygotic state, the zymograms observed in leaf homogenates are characterized in addition of the two expected bands by a third band of intermediate mobility. This extra band results from the random association of the two distinct monomers coded by the two alleles present in the heterozygotic locus, and corresponds to the heterodimeric form of the enzyme (Fig. 1). This molecular form occurs only in a diploid tissue such as the leaf, and cannot be produced in a mixture of haploid tissue such as pollen, since the two monomers coded by each of the two alleles remain partitioned at the level of each grain of pollen. The haploid nature of pollen, however, does not exclude a dimerization between monomers coded by separate loci, but this dimerization has never been observed between loci A and B of Got, whether from leaf or pollen. This phenomenon, commonly observed for this enzyme, is due to the fact that the molecular forms of the enzyme coded by the two loci are each confined to different cellular compartments (in this case, cytosol and mitochondria), and that inter-locus dimerization is therefore physically impossible.

Pgd, dimeric in structure like Got, is, on the contrary, an illustration of the case where dimerization between two separate loci occurs. The hypothesis of two loci, A and B, one polymorphic for three alleles A0, A1 and A2, and the other monomorphic, enables a satisfactory explanation to be given of the four types of zymograms encountered (Plate B, Fig. 2). In *Pinus banksia*, O'Malley and Guries [1983], using haploid gametophytes, also showed these types of complex zymograms of Pgd, revealing two loci. On account of the very low frequency of appearance and the independence of the loci, the authors were led to suppose that a heterozygotic chromosome translocation must be responsible. For oil palm, the uniform distribution of these zymograms seems to point rather to a real genic duplication, existing in a fixed state in all individuals. As one of the loci is monomorphic, it has not been possible to determine the degree of linkage between the loci, and to judge beforehand the cytogenetic events at the origin of this duplication. However, the fact that all oil palms today retain the same trace of chromosome modification, confirms, if this were necessary, the monophyletic nature of the origin of this species. Also, the presence at one of the loci of a null allele, and of an allele (A_1) whose potential enzyme activity appears greater than that of the other active allele (A_2) [Koutou, 1983], shows a situation remarkably close to that encountered for Pgi in the genus *Clarkia* [Gottlieb, 1977]. The species in this genus, by duplication of one of the two ancestral loci, have acquired a third locus, where there can be found, next to a null allele, three alleles whose Michaelis constants are considerably different from those measured in the alleles of the primitive loci. As emphasized by Gottlieb [1977], such a situation would be an argument in favour of the theory of gene evolution by duplication [Ohno, 1970]. According to this theory, a gene, by maintaining its original function, enables the one that is duplicated from it to escape the action of preservative selection, and to accumulate numerous mutations. It is therefore not surprising to find at these duplicated loci not only a large number of null alleles, but also alleles coding for enzymes whose physicochemical properties differ from those of the enzymes coded by the alleles of the primitive locus.

The other five enzyme systems display more complex zymograms, either because they involve several loci, or because secondary isozymes, i.e., post-transcriptional modifications of the expression of one and the same gene, no longer characterize each

allele by a single band, but by several bands, often varying in number and intensity of colouring. Since these two causes are not mutually exclusive, they result in zymograms that are more tricky to interpret. In this case, the observation of progenies is particularly useful to distinguish between the two phenomena and determine how genetic variation of enzyme systems is materialized by electrophoresis.

In the case of Pgm and Idh, interpretation has remained easy on account of the small number of bands characteristic of alleles (Pgm) or of their very strong staining intensity (Idh).

For Pgi, the zymograms observed were also reminiscent of a duplicated gene situation similar to that encountered in Pgd. The duplication of genes coding for Pgi has already been observed in other plants, whether the loci are linked, as in *Dactylis*, [Lumaret, 1981], or independent, as in rice [Trousot and Second, 1980] or in the species of the genus *Clarkia* already mentioned. However, one difficulty has been the variation shown by the zymograms of the alleles, which may vary from one very strong band followed by a few weak bands, to two or three bands of the same intensity. It appears that the age of extracts, the quality of pollen, and the type of extraction and migration buffer used all have an influence on the instability of the zymograms, which is probably linked to a partial denaturing of the enzyme. Under these conditions, it has been considered preferable to interpret the zymograms of the different allele forms by considering only the first band as characteristic, and the two or three more rapid bands as secondary isozymes. In coffee, Berthou *et al.* [1980] have also observed an allelic expression of Pgi in the form of three inseparable bands, but without noting major variations in their intensity. As for Got, no dimerization between locus A and monomorphic locus B of Pgi was observed, which would seem to indicate that the products of the two loci remain separate in the cell, probably in cytosol and plastides.

In acid phosphatases, where the non-specificity of the substrate could permit several loci to be expressed, the low polymorphism displayed by the anodal part of the gel has caused the slow bands to be considered at present as secondary isozymes of a single locus.

Interpretation of Mdh was also made difficult by the large number of bands. Three zones, attributed to the expression of three loci, were cut out of the zymograms on the basis of segregations observed in progenies. Although the determinism of locus A seems obvious, the interpretation of locus B had to involve the existence of a null or recessive allele, which implies the non-detection of heterozygotic genotypes, and that of locus G is based on the tricky estimation of the thickness of band No. 11.

In general, it is important to emphasize the partial and provisional nature of this preliminary analysis of the genetic control of enzyme markers, for reasons involving different levels :

— Methodology.

Allele A3 of locus cath. Acp, for example, was detected only once, and its proximity to allele A2 could lead to doubts as to its individuality, at least within the limits of the electrophoretic techniques used.

— Interpretation.

Loci B and G of Mdh result from a global interpretation of complex zymograms. Although this interpretation is compatible with segregations observed up to now, it is possible that new

separations may ultimately bring it into question, and result in a more elaborate method of genetic interpretation.

— Sampling.

Sampling of each of the origins of the material used up to now is still insufficient, meaning that not all enzyme polymorphism has probably been revealed. Thus, recent observations of material of Cameroon origin have enabled two new alleles (Endo A'2 and An.B3 Acp) to be detected, and to assume that another polymorphic locus (An.A Acp) exists in the variations in intensity of the slow bands of anodal acid phosphatases.

CONCLUSIONS

Table V resumes the formal genetics of the nine enzyme systems. However, this analysis should be continued using material of more diversified origins, and also using other progenies. Although, for the majority of enzyme systems, genetic control appears clear and may ultimately be limited to the detection of new alleles, control of Mdh, Pgi and Acp is still unsatisfactory, and needs to be studied in more detail.

The study of enzyme polymorphism using vegetative extracts such as the leaf would be an elegant method of completing the analysis of genetic control elaborated from pollen. It would also be an interesting way of tackling the regulation of some structural genes in tissues of different type and ploidy, as well as the molecular structure of the enzymes coded by these genes. The transfer of pollen electrophoresis techniques to the leaf would also be of great value for determining individuals at an early stage, as well as for evaluating survey material, where pollen collection would be difficult to undertake.

Linkage between enzyme loci could be studied only partially for six loci ; however, the revelation of two linkage groups encourages research to continue. Indeed, linkage is an additional means of comparing populations by their gametic disequilibria, although it has been difficult to demonstrate this up to now in allogamous plants [Brown, 1979].

It would also be worthwhile to perform a n analysis of the genetic control of enzyme markers in *E. melanococca*, an oil palm of South American origin. Many levels of evaluation of genetic homology are now available thanks to the results obtained with *E. guineensis* : the 38 alleles of the 14 loci, the genic duplication of Pgd, the two linkage groups Got A — Skdh and Cath. Acp — Mdh G. These would allow a more general perception of gene organization in the genus *Elaeis* and the degree of divergence of these two species. This is a fundamental aspect of the genetic study of a plant, but which may also be of consequence for its improvement : for example, genetic recombination is an essential piece of data for exploiting the genetic variability of a species and for running an efficient breeding scheme ; the success of an inter-specific hybrid, such as *E. guineensis* × *E. melanococca* may also closely depend on the genic structure of the two genomes placed together.

Although this study is certainly incomplete, it enables individuals to be described and compared by their genotype at 14 loci, and is a preliminary tool for improving our understanding of the organization of genetic variability in oil palm.

It is also clear that the analysis of genetic control is not limited to a simple preliminary, but is also of interest in itself, since it gives us a better understanding of the structure and functioning of plant genes.



AVEZ-VOUS PENSÉ À VOUS RÉABONNER ?

(un bulletin d'abonnement est joint à cette revue)